



KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr

Certification of patent application no

1999 6332

▶ Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.12.23.

➤ *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.12.23*

2003.07.17

Freddy Strømmen

Freddy Strømmen
Seksjonsleder

Line Reum

Line Reum



PATENTSTYRET®
Styret for det industrielle rettsvern

16

PATENTSTYRET
20.DES99 996332

20 DES. 1999

EK/KBN

17.12.99

E10509

UTSKILT FRA SØKNAD nr. 19986133 av 23/12-1998

Preben Lexow
Fløensbakken 41A
5009 Bergen

Oppfinner:

Søkeren

Metoder til bruk ved sekvensanalyse

Foreliggende oppfinnelse er utskilt fra patentsøknad 19986133 som omfatter en metode for DNA-sekvensering som inneholder følgende trinn:

Første trinn tar utgangspunkt i en ren DNA-populasjon bestående av DNA-sekvensen som skal sekvenseres. DNA-molekylene kuttet/brekkes på en uspesifikk måte slik at det dannes en populasjon med DNA-molekyler bestående av biter (heretter kalt DNA-biter) av den opprinnelige sekvensen.

Annet trinn består i å erstatte baseparene i DNA-bitene med 4 ulike DNA-sekvenser (heretter kalt DNA-fragmenter) som representerer hver av de fire basene adenin, cytosin, guanin og tymin. Der hvor det har vært basepar A-T, settes det altså inn "fragment A", C-G byttes ut med "fragment C" osv. Dermed genereres nye DNA-molekyler hvor den opprinnelige baserekkefølgen på f.eks. ACGTT... erstattes med fragment A - fragment C - fragment G osv. Lengden på disse fire DNA-fragmentene kan i prinsippet variere i lengde fra 2bp til flere hundre kbp (eller mer om ønskelig), alt etter behov. Tilsvarende kan DNA-fragmentene inneholde reportergener og annen biologisk informasjon eller kun bestå av sekvenser uten kjent biologisk funksjon.

I tredje trinn avleses rekkefølgen av de fire typene DNA-fragmenter for hvert enkelt DNA-molekyl. Dermed finner man baserekkefølgen i de opprinnelige DNA-bitene indirekte.

I fjerde trinn benytter et dataprogram overlappen mellom DNA-bitene til å sette sammen informasjonen fra trinn 3 til sekvensen på DNA-sekvensene som ble brukt som utgangspunkt.

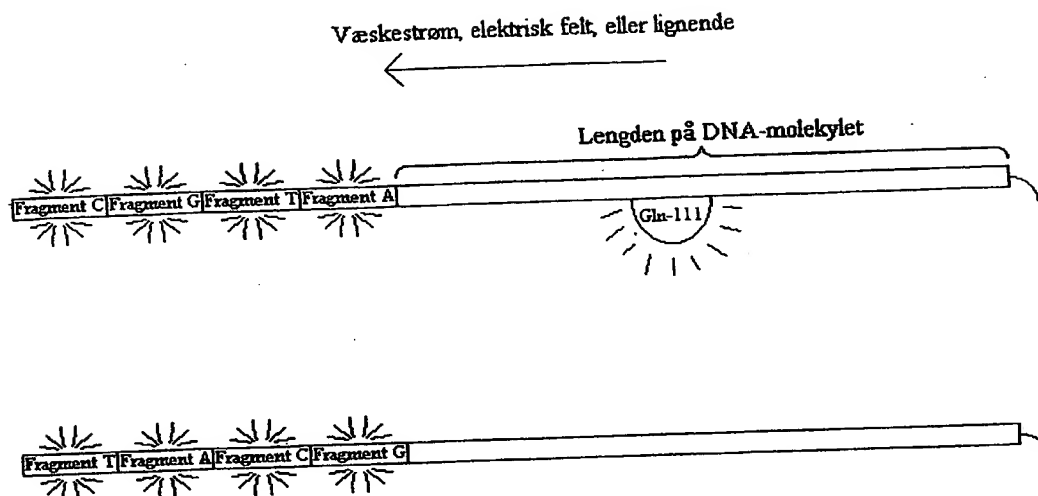
Foreliggende oppfinnelse vedrører metoder for kvantitering, størrelsesbestemmelse og identifisering av DNA-molekyler, som vil være metoder til bruk ved sekvensanalyse

Metoder for kvantitering, størrelsesbestemmelse og identifisering av DNA molekyler:

Gel elektroforese er et viktig genteknologisk verktøy til å kvantitere og størrelsesbestemme DNA molekyler. Metodikken som er omtalt i patentsøknad nr. 19986133 kan tillegg til DNA sekvensering også erstatte andre oppgaver som tradisjonelt har vært løst med gel elektroforese. Hvis en populasjon med DNA molekyler ønskes kvantisert og størrelsesbestemt kan man merke DNA-molekylene med fluorescens, feste dem til en avlesningsplate og rette dem ut ved hjelp av en væskestrøm, elektrisk felt eller lignende. Vha en fluorescens scanner kan man dermed både telle og måle lengdene på DNA molekylene.

Sammenlignet med gel elektroforese har denne teknikken en rekke fordeler. Nøyaktigheten kan i prinsippet tilpasses et hvert behov ved å analysere et stort antall molekyler. Selv med en avlesningsplate på omlag 1x1 cm og kan man oppnå en meget høy presisjon. Sensitiviteten er også svært høy da metoden er basert på å registrere enkelt molekyler. Videre sparer man mye tid da man bl.a. slipper både å støpe og kjøre geler. «Dynamic range» er dessuten langt større enn ved gel elektroforese. DNA molekyler på noen hundre bp kan analyseres sammen med molekyler på flere hundre kb eller mer.

I motsetning til gel elektroforese hvor DNA molekyler kun identifiseres på grunnlag av lengde er det også mulig å få sekvensinformasjon ved å bruke «fluorescerende tags» som gjenkjenner spesifikke sekvenser. F.eks. kan man bruke fluorescerende prober eller fluorescens merkede DNA bindende proteiner. Alternativt kan man ligere inn adaptore som gjenkjenner overheng slik som beskrevet tidligere i patentsøknaden. Dermed blir det mulig å skille to like lange DNA molekyler med ulik basesammensetning i en heterogen DNA populasjon.



Figur 1. Identifikasjon av to ulike DNA molekyler med lik lengde. Figuren illustrerer hvordan man kan skille like lange DNA molekyler ved å bruke «fluorescerende tags». Det to DNA molekylene skiller seg fra hverandre ved å ha ulike basesammensetninger i den ene enden. Samtidig ser man at det øvre DNA molekylet har et bindingssete for Gln-111 (Gln-111 er en mutert variant av Eco-R1 som har omtrent lik DNA bindings spesifisitet men med redusert kutte evne). Lengden på DNA molekylene kan bestemmes ved å merke dem med EtBr, TOTO eller andre fargestoffer. Alternativt kan man merke begge endene med adaptere for så å måle avstanden mellom adapterne.

Metodene nevnt ovenfor er spesielt velegnede til ulike former for fingerprinting. F.eks. kan man identifisere en bakterie ved følgende fremgangsmåte: Den aktuelle bakteriekolonien lyses og behandles slik at man får frem bakteriens DNA. Deretter kuttet DNA molekylene med en klasse II restriksjons endonuklease som kutter utenfor sitt eget bindingssete, f.eks. HgaI. DNA molekylene ligger deretter med adaptere som gjenkjenner overhengene som har blitt laget. Til slutt festes DNA molekylene til en avlesningsplate, rettes ut ved hjelp av en væskestrøm, elektrisk felt eller lignende. Ved å scanne avlesningsplaten med en fluorescens scanner får man dermed frem et karakteristisk mønster basert på restriksjonslengder og sekvensinformasjon fra DNA molekylene ender.

Metoder for å konstruere adaptere

Det å lage adapterblandinger bestående av mange permutasjoner representerer en spesiell utfordring hvor tradisjonelle subklonings teknikker har klare begrensinger. F.eks. krever en adapterblending for alle permutasjoner av 5bp 1024 ulike konstruksjoner mens 10bp krever over 1 million ulike konstruksjoner. En strategi er å konstruere adapterne med et prinsipp som ligner det som brukes for å konstruere DNA chips: Først lager man ulike oligonukleotider på ulike adresser på samme måte som ved konstruksjon av DNA chips. Deretter bruker man det samme prinsippet til å feste DNA-framenter til oligonukleotidene på samme måte som man fester basepar til voksende oligonukleotider. Til slutt løser man DNA molekylene slik at man får en løsning med adaptere.

En annen metode er illustrert i figur2. Utgangspunktet er 8 ulike adaptere med et fragment hver. Disse kan brukes til å lage 16 ulike 2-fragmentsadaptere slik som illustrert i fig.2. Med utgangspunkt i 8 andre 1-fragmentsadaptere kan man lage 16 nye 2-fragmentsadaptere som igjen kan kombineres med de 16 første til å lage 256 ulike 4-fragmentsadaptere. På denne måten kan man lage adapterblandinger hvor antallet permutasjoner kun begrenses av antallet ulike molekyler det er plass til i løsningen. Antallet ulike 1-fragmentsadaptere som er

nødvendig initialt er lik antallet fragmenter i hver adapter x 4. Ønsker man f.eks. å lage 16-fragmentsadaptere (4.29×10^9 permutasjoner) trenger man 16×4 ulike 1-fragmentsadaptere initialt.

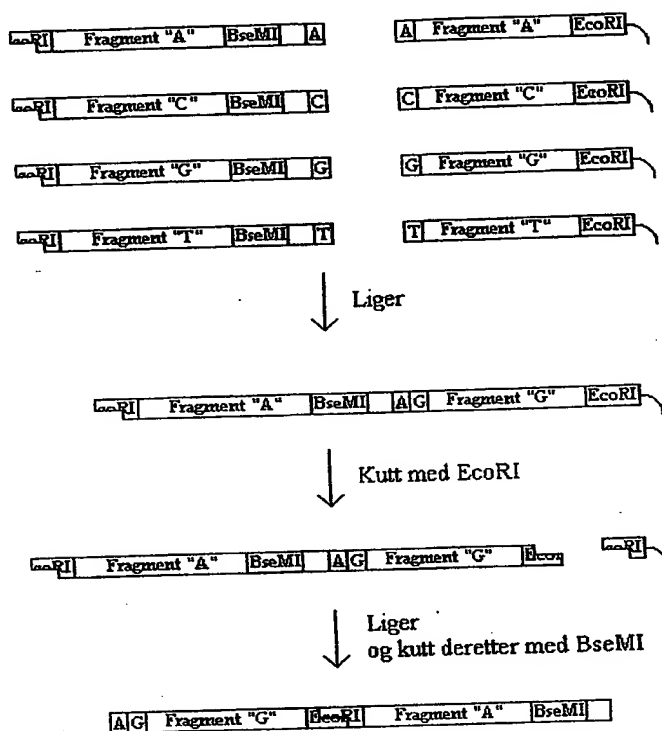


Fig 2. Metode for å konstruere adaptere. Utgangspunktet er 8 ulike 1-fragmentsadaptere slik som illustrert øverst. Adapterene til venstre består av et EcoRI overheng, et fragment som er spesifikt for den basen som er lengst til høyre på molekylet samt et kuttsete for BseMI. BseMI kutter utenfor sitt eget sete og vil lage et blunt kutt rett ved siden av basen lengst til høyre på molekylet. Adapterene er i tillegg fosfatasebehandlede slik at man reduserer liggeringer mellom disse adapterene. Adapterene til høyre består av et fragment som tilsvarer basen lengst til venstre på molekylet samt et kuttsete for EcoRI. Adapterene er i tillegg festet til et underlag for å hindre liggeringer mellom disse adapterene. Prosessen innledes med at de to adapterpopulasjonene blandes og liggeres. Dermed får man dannet 16 ulike DNA molekyler som tilsvarer alle permutasjoner med to fragmenter. Deretter kutter man med EcoRI og liggerer slik at molekylene sirkulariseres. Til slutt kutter man med BseMI og dermed har man en populasjon med 16 ulike 2-fragmentsadaptere.

Alternative sekvenserings metoder

En løsning med mål DNA som skal sekvenseres gjøres enkelttrådig og festes til et fast underlag. Deretter blandes og hybridiseres mål DNA'en med f.eks. 16-fragmentsadaptere. Adaptere som ikke har blitt hybridisert vaskes så vekk fra løsningen. Dermed sitter man kun igjen med adaptere som har overheng som er komplementære med den enkelttrådig mål DNA'en. Ved hjelp av f.eks. analysemetodene som er beskrevet under trinn3 i tidligere innsendte dokumenter (bl.a. 23/12-98 og 10/3-99) kan man finne frem til hvilke adaptere som fortsatt er igjen i løsningen og følgelig hvilke sekvensbiter på 16 bp mål DNA'en består av.

En annen strategi er å bruke de hybridiserte adapterene som primere for en PCR reaksjon etter at man har vasket vekk adaptere som ikke komplementerer mål DNA'en. Resultatet av hver PCR reaksjon blir to adaptere som er koblet sammen og hvor avstanden mellom de to adapterene tilsvarer den avstanden som adapter sekvensene har på mål DNA'en.



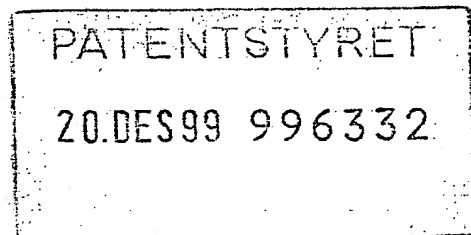
P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for sekvensanalyse, k a r a k t e r i s e r t v e d
beskrivelsen.



1e



20 DES. 1999

O. nr. E10509

Sammendrag

Metoder for å kvantifisere, størrelsesbestemme og identifisere DNA-molekyler til bruk ved sekvensanalyse.

